

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,
Please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.

DERWENT-ACC-NO: 2001-604270

DERWENT-WEEK: 200169

COPYRIGHT 1999 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Microbial mixture for fixing nitrogen and increasing solubility of phosphorus compounds to improve fertility of soil, comprises the co-fermentation of Azotobacter croococcum, Azospirillum brasiliense and Bacillus megaterium

INVENTOR: POLLAK, A

PATENT-ASSIGNEE: POLLAK A[POLLI]

PRIORITY-DATA: 2000SK-0000386 (March 16, 2000)

PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE	PAGES
MAIN-IPC			
FR 2806420 A1	September 21, 2001	N/A	011
C12P 039/00			
SK 200000386	October 8, 2001	N/A	000
C12P 039/00			
A3			

APPLICATION-DATA:

PUB-NO	APPL-DESCRIPTOR	APPL-NO	APPL-DATE
FR 2806420A1	N/A	2000FR-0005385	April 27, 2000
SK	N/A	2000SK-0000386	March 16, 2000

200000386A3

INT-CL_(IPC): C05F011/08; C05G003/08 ; C12N001/20 ;
C12P039/00 ;
C12N001/20 ; C12R001:01 ; C12R001:065 ; C12R001:11

ABSTRACTED-PUB-NO: FR 2806420A

BASIC-ABSTRACT: NOVELTY - Preparing a mixture (I) of
micro-organisms by
co-fermentation of the micro-organisms in nutrient soil, which is
nitrogen free
but contains phosphorus, is new.

DETAILED DESCRIPTION - Preparation of a mixture (I) of
microorganisms, suitable
for fixing nitrogen in the air and increasing the solubility of
phosphorus
compounds, by co-fermentation of microorganisms in nutrient soil
free of
nitrogen but containing phosphorus compounds, involves
multiplying the
bacterial strains *Azotobacter croococcum* CCM 4642 and
Azospirillum brasiliense
CCM 4644 for 22 hours at 28 deg. C, adding *Bacillus megaterium*
CCM 4643 and
fermenting the microorganisms together for 44-46 hours at 28
deg. C, under
aeration at 0.6 liters of air per liter of nutrient soil. An
INDEPENDENT CLAIM
is also included for a new mixture (I') of microorganisms, useful as
for (I),
comprising CCM 4642 and CCM 4644, each at $2-4 \times 10^9$ cells per
ml in nutrient
soil free of nitrogen but containing phosphorus compounds,
together with CCM

4643 at $3-4 \times 10^8$ cells per ml, where the grown biomass contains a total of $4.25-8.4 \times 10^9$ cells per ml and has pH 7.5-8.5.

ACTIVITY - Fertilizer. No biological data is provided.

MECHANISM OF ACTION - Nitrogen fixation; phosphate solubilization. No biological data is provided.

USE - (I) is useful in agriculture for improving the fertility of soil, by fixing nitrogen in the air and converting insoluble phosphate compounds into water-soluble phosphate.

ADVANTAGE - A single application of (I) improves the supply of both nitrogen and phosphate to plants. The mixture is active at temperatures from 36-38 deg.

C, and effective throughout the whole growing season of the plants. Nitrogen compounds are formed around the roots of the plants and directly absorbed, so that they are not leached from the soil to cause environmental contamination.

The need to apply artificial nitrogen and phosphorus fertilizers is eliminated.

CHOSEN-DRAWING: Dwg.0/0

TITLE-TERMS:

MICROBE MIXTURE FIX NITROGEN INCREASE SOLUBLE
PHOSPHORUS COMPOUND IMPROVE
FERTILITY SOIL COMPRISE CO FERMENTATION
AZOTOBACTER BACILLUS MEGATERIUM

DERWENT-CLASS: C04 D16

CPI-CODES: C04-F10; C11-A; C14-T; D05-A03C; D05-H01;

CHEMICAL-CODES:

Chemical Indexing M1 *01*

Fragmentation Code

M423 M431 M782 M905 P112 P113 P126

Specific Compounds

A00GTK A00GTM

SECONDARY-ACC-NO:

CPI Secondary Accession Numbers: C2001-179168

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :

2 806 420

(à n'utiliser qu pour les
commandes d reproduction)

(21) N° d' nregistrem nt nati nal :

00 05385

(51) Int Cl⁷ : C 12 P 39/00, C 12 N 1/20, C 05 F 11/08 // (C 12 N 1/
20, C 12 R 1:065, 1:11, 1:01)

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 27.04.00.

(30) Priorité : 16.03.00 SK 03860000.

(43) Date de mise à la disposition du public de la
demande : 21.09.01 Bulletin 01/38.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Ce dernier n'a pas été
établi à la date de publication de la demande.*

(60) Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

(71) Demandeur(s) : POLLAK ARPAD — SK.

(72) Inventeur(s) : POLLAK ARPAD.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire(s) : CABINET JOLLY.

(54) MELANGE DE MICROORGANISMES, DESTINE A LA FIXATION DE L'AZOTE DE L'AIR ET A
L'AUGMENTATION DE LA SOLUBILITE DE COMPOSES DU PHOSPHORE DANS L'EAU, ET SON PROCEDE
DE PREPARATION.

(57) L'invention concerne un procédé de préparation d'un
mélange de microorganismes destiné à la fixation de l'azote
d'air, et à l'augmentation de la solubilité de composés du
phosphore.

Ce procédé est caractérisé en ce que, par la fermenta-
tion commune de deux souches de microorganismes au
moins, dans un sol nutritif sans azote et contenant des com-
posés du phosphore, on fait se multiplier les souches bac-
tériennes *Azotobacter croococcum* CCM 4642 et
Azospirillum brasiliense CCM 4644 pendant environ 22
heures, à une température d'environ 28°C, puis la souche
bactérienne *Bacillus megatherium* CCM 4643 est ajoutée et
elles fermentent ensemble pendant environ 44-46 heures, à
une température d'environ 28°C, avec une aération d'envi-
ron 0,6 litre d'air par litre de sol nutritif.

Mélange de microorganismes, destiné à la fixation de l'azote de l'air et à l'augmentation de la solubilité de composés du phosphore dans l'eau, et son procédé de préparation.

5 Domaine technique

L'invention concerne un procédé de préparation d'un mélange de microorganismes destiné à la fixation de l'azote de l'air et à l'augmentation de la solubilité de composés insolubles du phosphore contenus dans le sol.
10 L'invention concerne également le mélange en question.

L'invention est importante du point de vue de la protection de l'environnement, grâce à une action de métabiose des micro-organismes.

15 Etat de la technique

Au cours des dernières décennies, l'agriculture a utilisé surtout des engrais artificiels azotés. Des rendements importants ont été ainsi atteints.

Si ces engrais n'ont pas été combinés avec de l'engrais de ferme, leur
20 utilisation excessive a rendu le sol acide et la vie microbienne a été étouffée ; le sol est devenu plus compact et les conditions d'eau et d'air du sol se sont aggravées.

En outre, les nitrates nuisibles ont pénétré dans les eaux souterraines. Le courant d'eau accompagnant des pluies violentes a
25 transporté l'engrais artificiel granulé vers des ruisseaux et les nitrates ont donc pénétré dans les rivières.

Du fait des fortes doses d'engrais artificiels azotés appliquées en une seule fois, les plantes – surtout les plantes de jardin – ont reçu une quantité excessive de nitrates, qui affectent négativement l'organisme
30 biologique et causent des effets nuisibles, surtout aux nourrissons et aux petits enfants, car ils provoquent la méthémoglobinémie dans le sang, qui peut être mortelle.

Un contrôle de la teneur en nitrates, surtout dans les légumes, a été introduit et leur limite supérieure a été déterminée. Mais il est très difficile
35 de faire un contrôle permanent de la teneur en nitrates de tous les légumes.

Pour cette raison, la possibilité pratique de la fixation bactérienne de l'azote de l'air devient de plus en plus actuelle. L'augmentation des prix des engrais artificiels azotés, à la suite de l'augmentation du coût de l'énergie, dont la production des engrais artificiels azotés est grande consommatrice, décroît ce besoin. Après avoir découvert la fixation bactérienne de l'azote de l'air, les efforts orientés vers l'utilisation de l'azote de l'air dans le domaine de l'agriculture se sont accentués, surtout au cours des dernières années.

On connaît la fixation de l'azote à l'aide des bactéries de la famille *Rhizobium* qui, sur les racines de plantes comme les haricots, le soja, le trèfle, forment des tubercules qui fixent l'azote de l'air. Mais cette fixation de l'azote est limitée aux plantes du domaine des papilionacées.

On connaît aussi des modes de préparation de mélanges qui utilisent les microorganismes pour le traitement des sols. La demande de brevet russe n°2072756 mentionne par exemple la façon de remettre en culture un sol endommagé par l'extraction de la houille. L'essentiel de ce procédé consiste dans un traitement mécanique du sol et dans l'ensemencement de grains qui ont été inoculés par des microorganismes, auxquels, éventuellement, si c'est nécessaire, dans le cas d'un sol très acide, on ajoute un autre microorganisme. Ce procédé ne résout ni le problème de la préparation du mélange par une fermentation commune, ni celui du mélange ainsi formé.

Les articles mentionnés ci-après, qui concernent le problème en question, décrivent certains procédés d'application de microorganismes. On mentionnera, par exemple, Chemical Abstracts, Vol. 124, n° 2, Columbus Ohio, US, n° 147 114, où l'on présente un procédé d'élimination biologique d'hydrocarbures du pétrole sous forme d'un mélange d'essence, de pétrole et d'huiles lubrifiantes contenus dans le sol. En principe, il s'agit d'une régénération des eaux souterraines et résiduaires. Un autre article, publié dans Compendex Engineering Information, US, Biol. Wastes 1987, décrit une information sur l'influence de la fixation non symbiotique de l'azote par des déchets organiques, avec utilisation de microorganismes. Les articles mentionnés ne répondent ni à la question liée à la façon de la préparation du mélange des microorganismes, ni au mélange produit.

Un autre concept connu par le brevet HU n° 207 751 élimine partiellement l'application des engrais inorganiques azotés et phosphorés,

mais ne répond pas à la question du retour du potassium. Un autre désavantage de ce mélange est le fait que ses effets sont thermiquement limités jusqu'à une température de 28°C. Ce mélange n'est donc efficace que pendant une courte période du printemps.

5 La demande internationale de brevet WO 96/34840 décrit l'utilisation de nouvelles souches bactériennes, qui fixent l'azote avec une résistance plus élevée contre les alcalis, et la transformation de deux bactéries dans le milieu contenant des additifs et microéléments. Ce mélange a un désavantage, à savoir que son utilisation est très limitée, surtout avec les
10 sols présentant un pH élevé.

 Le brevet US n° 4 952 229 décrit l'utilisation de certaines bactéries du sol et de bactéries fixant l'azote avec des additions de microéléments, par exemple sous forme de chélate et de différents minéraux. L'objet de ce brevet est un additif et une méthode visant à l'amélioration de la fertilité et
15 de la qualité des plantes, appliquée au sol ou aux feuilles des plantes. L'additif contient des microorganismes spécifiques et un acide organique, comme l'acide humique, l'acide fulminique et l'acide ulvinique. Il est possible d'ajouter des oligo-éléments minéraux, stabilisateurs de l'humidité. En principe, il s'agit d'une détermination du choix des additifs
20 et de la façon d'appliquer les additifs sur différentes espèces de plantes. Le brevet mentionné ne comprend pas la façon de préparer (produire) le mélange de microorganismes à l'aide d'une fermentation commune des microorganismes, sans minéraux ou microéléments contenant de l'azote, et ne mentionne pas la souche bactérienne importante *Bacillus megatherium*. Un inconvénient est que l'invention demande l'utilisation
25 d'un grand nombre de minéraux et de microéléments.

Résumé de l'invention

 Les inconvénients mentionnés ci-dessus sont substantiellement
30 éliminés par l'invention décrite ci-après, qui a pour but de préparer un mélange qui fertilise le sol, l'enrichit de l'azote de l'air et, en même temps, transforme le phosphore insoluble dans le sol en phosphore soluble.

 L'invention est basée sur la découverte imprévue de la fermentation commune de microorganismes, sans apport de minéraux et de
35 microéléments contenant de l'azote, ce mélange étant formé dans certaines conditions déterminées et, après application sur le sol, assurant pour les

plantes la fixation de l'azote de l'air et en même temps transformant le phosphore insoluble en phosphore soluble, ceci en une seule application. Le mélange est actif jusqu'à 36-38°C, et produit ainsi ses effets pendant toute la période de croissance des végétaux.

5 Le procédé de préparation du mélange destiné à la fixation de l'azote selon l'invention réside essentiellement dans une utilisation de certaines espèces de bactéries de la famille *Azotobacter*, qui sont capables de fixer l'azote de l'air au cours de leur multiplication dans le sol, en reprenant pendant leur durée de vie les formes synthétisées de l'azote dans le sol,
10 comme les nitrates, nitrites, ammonium, acides aminés, albumines ayant de petites molécules, qui fixent la matière organique du sol, d'où les racines les absorbent. Les matières azotées ainsi créées ne sont pas éliminées par lavage du sol et ne polluent pas l'environnement. Il en résulte l'avantage que, pendant la période de croissance des végétaux,
15 l'azote approvisionne les plantes d'une façon continue et harmonieuse.

Les souches bactériennes concernées sont *Azotobacter croococcum* CCM 4642 et *Azospirillum brasiliense* CCM 4644. Ces souches bactériennes ont fait l'objet d'un dépôt, en application du Traité de Budapest, sous les références mentionnées ci-dessus, auprès de la
20 Collection Tchèque de Microorganismes de l'Université Masaryk, Tvrdého 14, Brno, République Tchèque.

Les conditions les plus favorables à la multiplication de la souche bactérienne *Azotobacter croococcum* sont entre 16°C et 30°C, tandis que la température optimale pour la souche bactérienne *Azospirillum brasiliense*
25 est de 24°C à 38°C. Le sol est inoculé par ces deux espèces de souches bactériennes et elles sont cultivées dans le sol porté à 16°C au printemps et à 38°C en été. C'est ainsi que les plantes sont harmonieusement approvisionnées en azote.

Par ailleurs, en raison de l'utilisation excessive des engrais artificiels
30 contenant du phosphore, une grande quantité de composés du phosphore s'est accumulée dans le sol. Ce phosphore est insoluble dans l'eau et, par conséquent, il n'est pas utilisable par des plantes qui ont besoin de phosphore. Le microorganisme de l'espèce *Bacillus megatherium* CCM 4643, qui fait l'objet d'un dépôt, sous cette référence, dans la Collection
35 mentionnée ci-dessus, est capable, dans le cadre de son métabolisme énergétique, de transformer des composés du phosphore ayant de grandes

molécules, qui sont insolubles dans l'eau, en composés du phosphore solubles dans l'eau, et par conséquent d'approvisionner le sol en composés du phosphore solubles et utilisables par les plantes.

5 Le résultat de l'inoculation du sol par des microorganismes qui retiennent de l'azote et, en même temps, par des souches de microorganismes décomposant des composés du phosphore insolubles, est la métabiose, dans laquelle les fixateurs de l'azote fournissent l'azote nécessaire et le microorganisme *Bacillus megatherium* transforme des
10 composés du phosphore insolubles en composés du phosphore solubles dans l'eau. Les deux espèces de bactéries utilisent de l'énergie nécessaire pour leur propre croissance et leur multiplication et, en même temps, fournissent de l'azote et du phosphore aux plantes.

L'invention peut être mise en œuvre de la façon suivante : la biomasse compacte des microorganismes *Azospirillum brasiliense*,
15 *Azotobacter croococcum* et *Bacillus megatherium*, après avoir été diluée à une concentration convenable de 10 litres par hectare, est pulvérisée sur le sol, puis le sol est labouré jusqu'à la profondeur des semailles, en même temps qu'il est inoculé de façon telle qu'il soit possible d'abandonner les engrais artificiels contenant de l'azote et du phosphore.

20 Cette préparation contenant trois éléments peut être utilisée à la place des engrais artificiels.

L'essentiel de l'invention réside dans la façon de produire le mélange des microorganismes destinés à la fixation de l'azote de l'air, et à l'augmentation de la solubilité du phosphore insoluble dans le sol.

25 Selon l'invention, la souche bactérienne *Azotobacter croococcum* CCM 4642 se multiplie sur le sol nutritif, qui ne contient ni azote organique, ni azote inorganique, par fermentation à une température de 28°C environ, pendant 22 heures, puis le ferment d'*Azotobacter* est inoculé par 10% de l'inoculum de la souche bactérienne *Bacillus megatherium*
30 CCM 4643 de 22 heures. Pendant 22 heures, le microorganisme de la famille *Azotobacter* produit dans le milieu de fermentation la quantité d'azote nécessaire à la croissance du microorganisme de la famille *Bacillus megatherium*. La double fermentation continue encore pendant 22 - 24 heures, en aérant avec 0,6 litre d'air par litre du sol nutritif, avec une
35 agitation rotative de 120 tours/minute et à température de 28 °C. Après la fin de la culture, après 44-46 heures, le pH du sol de culture est compris

entre 6,8 et 8,5, avec une augmentation de 4-6 milliards de cellules/ml du milieu de la souche *Azotobacter croococcum* et de 150-200 millions de cellules/ml de la souche *Bacillus megatherium* CCM.

5 En outre, selon l'invention, la souche bactérienne *Azospirillum brasiliense* CCM 4644 se multiplie sur le sol nutritif qui ne contient ni source organique, ni source inorganique d'azote, grâce à la fermentation à une température de 28°C pendant 22 heures, puis la culture multipliée du microorganisme *Azospirillum brasiliense* et inoculée par 10% de l'inoculum de la souche bactérienne *Bacillus megatherium* CCM 4643 de
10 22 heures et, jusqu'à cette période, la souche bactérienne *Azospirillum brasiliense* produit une quantité d'azote nécessaire à la croissance du microorganisme *Bacillus megatherium*. La double fermentation continue encore pendant 22-24 heures en aérant avec 1 litre d'air par litre du milieu de fermentation, à 120 tours/minute et à la température de 28°C. Après la
15 fin de la fermentation, le pH du milieu de fermentation est de 6,8 – 8,5 et la croissance de la souche *Azospirillum brasiliense* est de 4 – 6 milliards de cellules/ml du milieu et celle de la souche *Bacillus megatherium* est de 150 – 200 millions de cellules/ml de milieu.

Pendant la mise en œuvre de l'invention, aucun produit secondaire
20 ne se produit. La biomasse des microorganismes peut être utilisée en tant que ferment, qui ne subit pas d'autre traitement. L'eau de lavage des ferments peut être versée dans les tuyaux d'évacuation, car elle enrichit l'eau des rivières de différentes espèces de bactéries rares.

25 Exemples de mise en œuvre de l'invention

Exemple 1

Dans un ballon, on met un mélange de 200 ml de phosphate dihydrogéné de potassium 0,3 g, de chlorure de calcium 0,2 g, de sulfate
30 de magnésium 0,3 g, de sulfate de potassium 0,2 g, de chlorure de sodium 0,4 g, de chlorure ferrique 0,05 g, de carbonate de calcium 5,0 g, de mélasse 30,0 g, du sucre fermentescible 10,0 g, par 1000 ml de sol nutritif, et, pendant 40 minutes, le sol est stérilisé à une température de 125°C, puis on ajoute 1 ml de solution d'oligo-éléments : acide borique
35 5,0 g, molybdate d'ammonium 6,0 g, iodure de potassium 0,5 g, bromure

de sodium 0,5 g, sulfate de zinc 0,3 g, sulfate d'aluminium 0,3 g, par 1000 ml de sol nutritif.

Au contenu de l'ampoule lyophilisée de deux souches bactériennes *Azotobacter croococcum* et *Azospirillum Brasiliense* il faut ajouter 5 ml d'eau stérilisée et on obtient une suspension. Les deux ballons sont inoculés par 1,0 ml de suspension. Les ballons inoculés sont mis sur une installation d'agitation horizontale et sont cultivés à une température de 28°C, à 160 tours/minute, pendant 48-72 heures, jusqu'à une croissance suffisante de la biomasse. C'est ainsi que l'inoculum de base est préparé.

Puis, 400 ml de sol nutritif de composition mentionnée ci-dessus sont mis dans le ballon et 3-4 ml d'inoculum de base sont inoculés et cultivés sur l'installation d'agitation horizontale, à la température de 28°C, pendant 48 heures. C'est ainsi que l'inoculum de préparation est obtenu.

Ensuite, 1000 litres de sol nutritif sont stérilisés à une température de 125 °C pendant 40 minutes. Après refroidissement, l'inoculation est faite par 1,6 l de l'inoculum de préparation. Le sol inoculé fermente pendant 22 heures à la température de 28°C, en aérant avec 0,6 litre d'air par litre de milieu de fermentation, à 120 tours/minute. C'est ainsi que l'inoculum de travail de consistance convenable est obtenu de deux espèces de microorganismes. Pour limiter la production de la mousse, il faut ajouter 0,2 – 1,0 l/m³ de produit d'écumage. La valeur du pH du sol nutritif est de 6,8 – 7,0.

Exemple 2

Dans un ballon, on met un mélange de 200 ml de phosphate dihydrogéné de potassium 0,3 g, de mélasse 30,0 g, de coorn-steep 0,5 g, de peptone 0,3 g, de carbonate de calcium 5,0 et on stérilise à la température de 125°C pendant 40 minutes.

Dans le contenu de l'ampoule lyophilisée de la souche bactérienne *Bacillus megatherium*, on ajoute 5 ml d'eau stérile pour chaque ampoule et, ainsi, une suspension se forme, puis les deux ballons sont inoculés avec 1,0 ml de suspension. Les ballons inoculés sont mis sur l'installation d'agitation horizontale et sont cultivés à la température 28°C, pendant 48 heures, à 160 tours/minute.

Ensuite, 400 ml de sol nutritif sont mis dans le ballon et 1-2 ml d'inoculum de base sont inoculés et mélangés sur l'installation d'agitation horizontale, à la température de 28°C, pendant 24-48 heures et, à l'aide d'un microscope, l'état de végétation de la culture et la formation des spores sont contrôlés. C'est ainsi que l'inoculum de préparation est obtenu.

Puis, 1000 litres de sol nutritif sont stérilisés à la température de 125°C pendant 40 minutes. Après refroidissement, l'inoculation est faite par 3 morceaux d'inoculum de préparation de volume de 400 ml. Le sol inoculé fermente pendant 22 heures à la température de 28°C, en aérant avec 0,6 litre d'air par litre de sol nutritif, à 120 tours/minute. Pour limiter la production de la mousse il faut ajouter 0,2 – 1,0 l/m³ de produit d'écumage. La croissance de la culture est suivie à l'aide d'un microscope, de manière que la croissance se développe jusqu'à l'état de végétation, sans formation de spores. La valeur du pH du sol nutritif est de 6,8 – 7,0.

Exemple 3

Dans deux fermenteurs ayant un contenu total de 10-12 m³, de volume utile de 5,0 – 6,0 m³, une masse de 4,5 et 4,5 m³ du sol nutritif sans contenu d'azote décrit à l'Exemple 1 est stérilisée et est inoculée par 10 % d'inoculum de travail contenant la souche bactérienne *Azotobacter croococcum* selon l'Exemple 2. Puis elle est cultivée à la température de 28°C pendant 22 heures, en assurant l'aération simultanée avec 0,6 litre d'air par litre de sol nutritif, à 120 tours/minute. Puis, le sol fermenté est inoculé par 10% de la culture du microorganisme *Bacillus megatherium* selon l'Exemple 2 et la double fermentation continue encore pendant 22-24 heures. Après fermentation de 44-46 heures, le pH du sol nutritif est de 7,7 – 8,5 et la souche bactérienne *Azotobacter croococcum* atteint une croissance de 4-8 milliards de cellule/ml du milieu.

Dans deux fermenteurs de volume utile de 5,5 – 6,0 m³, on met 4,5 et 4,5 m³ du sol nutritif sans azote décrit dans l'Exemple 1, la masse est inoculée par 10% d'inoculum de travail ayant la teneur de la souche bactérienne *Azospirillum brasiliense* selon l'Exemple 1. La culture dure 22 heures, à une température de 28°C, en assurant l'aération avec 0,6 litre d'air par litre de sol nutritif, à 120 tours/minute. Après la fin de la

fermentation, le pH du milieu de fermentation est de 7,5 – 8,5 et la souche *Azospirillum brasiliense* a atteint une croissance de 4,6 milliards de cellules/ml de milieu et la souche *Bacillus megatherium* atteint 150-200 millions de cellules/ml de milieu.

- 5 Puis, en mélangeant les deux types de ferments et en les homogénéisant, on obtient le produit défini composé de trois éléments :
Azotobacter croococcum à 2-4 milliards de cellules/ml, *Azospirillum*
brasiliense à 2-4 milliards de cellules/ml, *Bacillus megatherium* à
300 – 400 millions de cellules/ml de milieu, et la biomasse multipliée
10 comprend au total de 4,1 milliard de cellules/ml jusqu'à 8,2 milliards de
cellules/ml de milieu nutritif, avec un pH de 7,5 – 8,5.

Utilisation dans l'industrie

- 15 Un mélange de microorganismes destiné à la fixation de l'azote de l'air, à l'augmentation de la solubilité des composés de phosphore dans l'eau, est préparé d'après le procédé décrit ci-dessus et ce mélange est utilisable dans l'agriculture.

REVENDICATIONS

1. Procédé de préparation d'un mélange de microorganismes destiné à la fixation de l'azote d'air, et à l'augmentation de la solubilité de composés du phosphore, caractérisé en ce que, par la fermentation commune de deux souches de microorganismes au moins dans un sol nutritif sans azote et contenant des composés du phosphore, on fait se multiplier les souches bactériennes *Azotobacter croococcum* CCM 4642 et *Azospirillum brasiliense* CCM 4644 pendant environ 22 heures, à une température d'environ 28°C, puis la souche bactérienne *Bacillus megatherium* CCM 4643 est ajoutée et elles fermentent ensemble pendant environ 44-46 heures à une température d'environ 28°C, avec une aération d'environ 0,6 litre d'air par litre de sol nutritif.

2. Mélange de microorganismes destiné à la fixation de l'azote d'air et à l'augmentation de la solubilité des composés de phosphore, caractérisé en ce qu'il se compose de deux souches de microorganismes, *Azotobacter croococcum* CCM 4642, à 2 - 4 milliards de cellules/ml et *Azospirillum brasiliense* CCM 4644, à 2 - 4 milliards de cellules/ml dans un sol nutritif sans azote, contenant des composés du phosphore, et de souches *Bacillus megatherium* CCM 4643, à 300 - 400 millions de cellules/ml, la biomasse multipliée comprenant au total 4,25 à 8,4 milliards de cellules/ml du milieu nutritif, avec un pH de 7,5 à 8,5